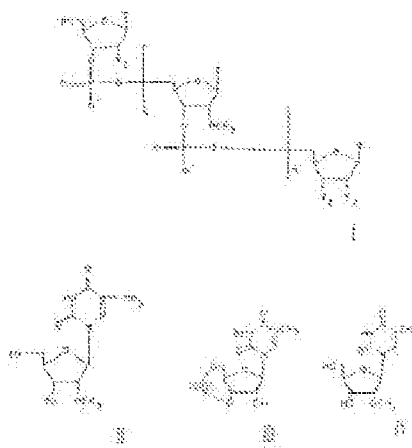


**OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE AND SYNTHETIC RAW MATERIAL THEREOF****Publication number:** JP2264792 (A)**Publication date:** 1990-10-29**Inventor(s):** OTSUKA EIKO; INOUE HIDEO**Applicant(s):** AJINOMOTO KK**Classification:**

- **international:** **C07H21/02; C07H19/067; C07H19/10; C07H19/167; C07H21/04; C07H23/00; C12N15/10; C07H21/00; C07H19/00; C07H23/00; C12N15/10; (IPC1-7): C12N15/10; C07H21/02; C07H21/04; C07H23/00**

- **European:****Application number:** JP19890085456 19890404**Priority number(s):** JP19890085456 19890404**Abstract of JP 2264792 (A)**

NEW MATERIAL: A compound expressed by formula I [R is H, acyl or (substituted) phosphoryl; T is thymine-1-yl; Y1 to Y3 are H, OH or lower alkoxy, etc.; B is thymine-1-yl, adenine-9-yl or guanine-9-yl, etc.; n is 1-100]. USE: Carrier for isolating poly(A)<sup>+</sup>-mRNA. Useful for promotion of efficiency in isolation of poly(A)<sup>+</sup>-mRNA as forming stable hybrid with poly(A) part. PREPARATION: The aimed substance is synthesized from nucleotide derivative expressed by formula II (X is monomethoxytrityl or dimethoxytrityl, etc.; Y is H or o-chlorophenyl phosphoric acid, etc.) using, e.g. DNA automatic synthesizer. Besides, the compound expressed by formula II is new substance and obtained from, e.g. ribothymidine as starting raw material through compounds expressed by formula III and formula IV.



.....  
Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-264792

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)10月29日

C 07 H 21/02  
21/04  
23/00  
// C 12 N 15/10

B 7822-4C  
7822-4C  
7822-4C

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全10頁)

⑭ 発明の名称 オリゴヌクレオチド誘導体及びその合成原料

⑮ 特 願 平1-85456

⑯ 出 願 平1(1989)4月4日

特許法第30条第1項適用 1989年3月1日 日本薬学会発行の「日本薬学会第109年会講演要旨集Ⅲ」に発表

⑰ 発 明 者 大 塚 栄 子 北海道札幌市中央区南10条西18丁目1番3号  
⑰ 発 明 者 井 上 英 夫 北海道札幌市中央区南7条西16丁目1-22  
⑱ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号  
⑲ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外3名

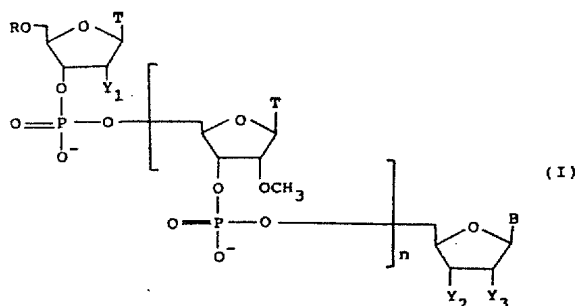
明 細 書

1. 発明の名称

オリゴヌクレオチド誘導体及びその合成原料

2. 特許請求の範囲

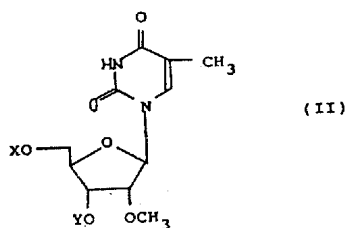
(1) 下記一般式(I)で表されるオリゴヌクレオチド誘導体。



式中、Rは、水素原子、アシル基、又は置換基を

有していてもよいホスホリル基を表し、Tは、チミン・1-イル基を表し、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>及びY<sub>3</sub>は、相互に同一であってもよく又異なってもよく、水素原子、ヒドロキシル基、低級アルキルオキシ基又は低級アルキルシリル基を表し、Bは、チミン・1-イル基、アデニン・9-イル基、グアニン・9-イル基、シトシン・9-イル基、ウラシル・1-イル基又はヒボキサントシン・9-イル基を表し、nは、1~100の整数を表す。

(2) 下記一般式(II)で表されるヌクレオチド誘導体。



式中、Xは、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基又は置換基を有していてもよいホスホリル基を表し、Yは、水系原子、 $\alpha$ -クロルフェニル炭酸、 $-P(OCH_3)-N-(CH(CH_3)_2)_2$ 、 $-P(OCH_2CH_2CN)-N-(CH(CH_3)_2)_2$  又は $-CO-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_n-$  (CPG誘導体) (ここに、m及びnは、それぞれ、1~10の整数である) を表す。ただし、Xが置換基を有していてもよいホスホリル基のときは、Yは水系原子である。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、有用な遺伝子のクローニングに際し、通常行なわれているmRNAの分離操作を効率化することに用いることができるヌクレオチドの誘導体、その合成原料であるヌクレオチドオリゴマ

poly(A)<sup>+</sup>-mRNAの単離収率が必ずしも充分でなく、クローニングの効率を向上させる為にはポリ(A)部分と更に安定なハイブリッドを作るオリゴマーの発見が強く望まれていた。

#### 発明が解決しようとする問題

目的有用遺伝子をクローニングする上で、その効率に大きくかわかるpoly(A)<sup>+</sup>-mRNA単離操作において、オリゴ(dT)-セルロースカラムに代り収率がより向上できる技術、すなわちポリ(A)とより安定なハイブリッドを形成しうる性質を有する新規オリゴマーの開発が要請されている。

#### 発明の構成および作用効果

本発明者は、上記問題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、デオキシリボヌクレオチドに比べ、オリゴ(2'-O-メチルリボヌクレオチド)が相

一及び更にその合成原料であるヌクレオチドに関する。これらの物質は、いずれも、新規化合物である。

#### 従来の技術

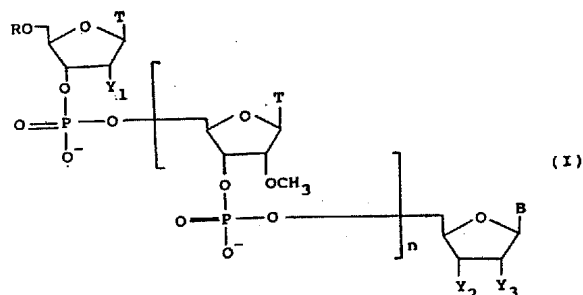
有用遺伝子をクローニングする際、一般的にはその遺伝子が発現している生物材料より全mRNAを分離し、そのmRNAよりcDNAを合成し、クローニングした後、目的遺伝子をスクリーニングすることが行われている。mRNAを分離する操作においては、mRNAがポリ(A)テール(poly(A)<sup>+</sup>-mRNA)を有することを利用し、ポリ(A)に相補的なオリゴデオキシシミシル酸をセルロース等に固定化したいわゆるオリゴ(dT)-セルロースカラムを使用して、ハイブリダイゼーション効果を利用してポリ(A)を持たないRNA(poly(A)<sup>-</sup>-RNA)との分離を行っている。しかし、この操作における

補鎖オリゴリボヌクレオチドとより安定なハイブリッドを形成することを見い出し、ハイブリダイゼーションプローブとして有用であることを報告した(H. Inoueら、Nucleic Acids Res., 15(15) 6131頁、1987年)。更に、ハイブリッドの安定性におけるオリゴマーの構造上の寄与を詳細に検討した結果、2'-O-メチルウリジルの代りに2'-O-メチル-5-メチルウリジル酸をオリゴマーの構成ユニットに用いることにより、相補鎖中のアデニル酸ユニットと強固に結合しオリゴリボヌクレオチドとの熱的安定性が增大することを見い出した。この知見に基づいて、デカリボアデニル酸とその相補鎖であるデオキシリボチミシル酸、2'-O-メチルウリジル酸及び2'-O-メチル-5-メチルウリジル酸のそれぞれのデカマーを合成して熱的安定性(Tm値)をそれぞれ測定したところ、デカ2'-O-メチル-5-メチルウリジ

ル酸が著しくすぐれた性質を有することを見出し、  
本発明を完成するに至った。

以下、本発明を詳細に説明する。

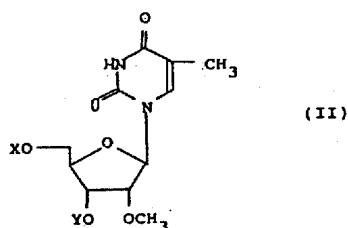
本発明は、次の一般式（Ⅰ）で表されるオリゴヌクレオチド誘導体に関する。



式中、Rは、水素原子、CMセルロース、ラテックス粒子などのカルボニル残基等のアシル基、ホスホリル基、又は置換基を有していてもよいホス

mRNA の分離操作に直接使用される化合物であり、R が水素原子又は置換基を有しないホスホリル基である化合物（オリゴヌクレオチド）は、前者の化合物の合成原料となりうるばかりでなく、前者の化合物をどのような方法で合成したにしろ、後者の化合物は前者の化合物の構成部分としての中心的機能を果たすのである。

本発明は、又、次の一般式(Ⅱ)で表されるヌクレオチド誘導体にも関する。



式中、Xは、モノメトキシトリチル基、ジメトキ

ポリル基例えばセルロースなどの水酸基を有する化合物と燐酸とのエステル結合を有するホスホリル基を表し、Tは、チミン-1-イル基を表し、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>及びY<sub>3</sub>は、相互に同一であってもよく又異なっているとしてもよくて、水素原子、ヒドロキシル基、メトキシ基、エトキシ基等の低級アルキルオキシ基又は低級アルキルシリル基を表し、Bは、チミン-1-イル基、アデニン-9-イル基、グアニン-9-イル基、シトシン-9-イル基、ウラシル-1-イル基又はヒポキサンチン-9-イル基を表し、nは1~100の整数を表すが、実用的には平均鎖長がn=10~40のものを用いることができる。

因みに、一般式 (I) の誘導体において、R が上記のようなアシル基（これは担体と称されることもある）又は置換基（これも担体と称されることもある）を有するホスホリル基であるものは、

シトリチル基又は例えば、 $\alpha$ -クロルフェニル基等の置換基を有していてもよいホスホリル基を表し、 $Y$ は、水素原子、 $\alpha$ -クロルフェニル燐酸、 $-P(OCH_3)-N-(CH(CH_3)_2)_2$ 、 $-P(OCH_2CH_2CN)-N-(CH(CH_3)_2)_2$ 又は $-CO-(CH_2)_m-CONH-(CH_2)_n-(CPG誘導体)$ （ここに、 $m$ 及び $n$ は、それぞれ、1~10の整数である）を表わす。ただし、 $X$ が置換基を有していてもよいホスホリル基のときは、 $Y$ は水素原子である。一般式(II)の化合物は、一般式(I)の化合物の合成原料として使用することができる。

次に、これらの化合物の合成法の例を説明する。

本発明のオリゴ（2'-O-メチル-5-メチルウリジル酸）部分を合成する為には、先ずその構成ヌクレオシドである2'-O-メチル-5-メチルウリジン（化合物3）を製造する様に合成し

特開平2-264792 (4)

(第1図)、次に常法により(例えば、  
H. Yoshikawa et al., *Tetrahedron Lett.*, 5065  
(1967))、5'位水酸基に直接リン酸基を導入し2'-  
O-メチル-5-メチル-5'-ウリジル酸を得、  
それをジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)  
等の縮合剤を用いて重合する方法を採用すること  
ができる。または、化合物3を後述する様に3'-  
フォスホロアミデート誘導体(化合物5)とし、  
公知の方法に従い(S. Shibahara et al., *Nucleic  
Acids Res.*, 15(11), 4403 (1987))、DNA自動  
合成機(アプライドバイオシステム社製、モデル  
380A)を用いて容易に合成することができる。  
一方、オリゴ(2'-O-メチル-5-メチルウ  
リジル酸)誘導体を製造する為には、先に述べた  
2'-O-メチル-5-メチル-5'-ウリジル酸の  
DCCによる重合反応において、公知の方法  
(P. T. Gilham, *JACS*, 86, 4982 (1964))に従い、セル

知の方法(H. Inoue et al., *Nucleic Acids  
Symposium Series*, No 16, 165 (1985)、W. T.  
Harkiewicz, *J. Chem. Res.*, (S) 24-25 (1979))に準  
じて、テトライソプロピルジシロキサン-1,3-  
ジイル基で保護した後、公知の方法(H. Inoue et  
al. の前出の報文(1987))に準じて、適当な溶  
媒中トリエチルアミンの存在下塩化ベンゾイルで  
処理することにより<sup>3</sup>N位を選択的に保護すること  
により得ることができる。

また、2'-O-メチル-5-メチルウリジン-  
3'-フォスホロアミダイト誘導体(化合物5)  
及び2'-O-メチル-5-メチルウリジン-3'-  
CPG誘導体(化合物6)の製造は、公知の方法  
(S. Shibahara et al. の前出の報文、L. J. McBride  
et al., *Tetrahedron Lett.*, 24, 245 (1983)参照)  
に従い合成できる(第2図並びに実施例4及び5  
参照)。また、ここで合成したフォスホロアミ

ロース等を同時に反応させ、セルロース誘導体等  
とすることが簡便である。また一方、先に述べた  
自動合成機により合成した5'末端水酸基を有する  
オリゴ(2'-O-メチル-5-メチルウリジル酸)  
の5'末端水酸基に燐酸基を導入した後に、同様に  
セルロース等と反応させることもできる。

また一方、5'末端水酸基を有したオリゴ(2'-  
O-メチル-5-メチルウリジル酸)とCM-  
セルロースまたはラテックス粒子等とを縮合剤  
(DCC等)を用いて結合させ、セルロースある  
いはラテックス誘導体(K. Kuribayashi et al.,  
*Nucleic Acids Symposium Series*, No 19, 61  
(1988)参照)等とすることも可能である。

化合物3の製造は、リボチミジンを出発原料  
として例えば先ず化合物1を得た後合成できる  
(第1図及び実施例1~3参照)。因みに、化合  
物1の合成は、リボチミジンの3',5'水酸基を公

ダイト誘導体(化合物5)の他に、亜燐酸の保護  
基としてシアノエチル基を有する化合物も、同様  
の方法(S. Shibahara et al. の前出の報文、  
N. D. Shinnha et al., *Nucleic Acids Res.*, 12,  
4539 (1984)参照)に従い合成することができる。

本発明に関して肝要な点は、従来より一般に使  
用されているオリゴ(dT)-セルロースのオリ  
ゴ(dT)に比べて、オリゴ(2'-O-メチル-  
5-メチルウリジル酸)がオリゴリボアデニル酸  
(オリゴ(rA))と著しく安定なハイブリッド  
を形成する性質を有することを発見したことにあ  
る。

以下、この点について詳述する。すなわち、そ  
れらのハイブリッドの熱的安定性(T<sub>m</sub>値)を実  
際に測定する為、デカリボアデニル酸を公知の  
方法(P. Kierzek et al., *Biochemistry*, 25, 7840  
(1986)参照)に従い合成し(実施例6)、また

デカ(2'-O-メチル-5-メチルウリシル酸)は、実施例4及び5により製造した化合物5及び6を用いてDNA自動合成機により常法通り(S. Shibahara et al.の前出の報文参照)合成した(実施例7)。一方、比較実験用のオリゴマーであるデカデオキチミシル酸は常法により市販試薬を用いて、デカ(2'-O-メチルウリシル酸)は公知の方法(S. Shibahara et al.の前出の報文参照)に従い、それぞれ、DNA自動合成機を用いて合成した。

それぞれのオリゴヌクレオチドは常法により定置した後に、熱的安定性測定用試料とした。それぞれのハイブリッドのTm値の測定は常法に従い、ベックマンDU-8B型分光光度計を用いて測定した(第3図及び実施例8参照)。この結果、それぞれのハイブリッドのTm値は、18.9℃、21.0℃、31.1℃となり、デカ(2'-O-メチル-5-

メチルウリシル酸)とデカリボアデニル酸とのハイブリッドが他のハイブリッドと比べて、Tm値が約10℃も高く、著しく安定であることを発見した。

以上のことより、オリゴ(2'-O-メチル-5-メチルウリシル酸)は、そのセルロース結合体として、現在市販されているオリゴ(dT)-セルロースに代わる新規poly(A)<sup>+</sup>-mRNA単離用担体として使用できることが充分期待される。

以下、実施例により本発明を具体例的に説明する。

#### 実施例

以下、実施例により本発明を更に説明する。

#### 実施例1

(N<sup>3</sup>-Benzoyl-5-methyl-3', 5'-O-(tetraisopropyl-disiloxane-1,3-diyl)uridine(化合物1)の合成)

C5 - CH<sub>3</sub>),

1.12-1.06 (m, 28H, TIPDS group).

#### 実施例2

(N<sup>3</sup>-Benzoyl-5-methyl-2'-O-methyl-3', 5'-O-(tetraisopropyl-disiloxane-1,3-diyl)uridine(化合物2)の合成)

実施例1で得た化合物1(13.69g、22.6mmol)をベンゼン80mlに溶解し、酸化銀(14.7g、63.3mmol)を加え、sonicatorに約10分かけた。ヨウ化メチル(65.0ml、1045mmol)を加え、45℃で3日間攪拌した。反応混合物を尹過し、溶媒を減圧下留去後、CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>Oで分液し、有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(C-200、300g、CHCl<sub>3</sub>)で精製し、化合物2を泡状物質として6.75g(48.2%)得た。さらに、分離できなかったフラクションを棄め、シリカゲルカラムクロマトグラ

5-Methyl-1,3-O-(tetraisopropyl-disiloxane-1,3-diyl)uridine(16.67g、33.3mmol)を塩化メチレン250mlに溶解し、トリエチルアミン(6.3ml、45.2mmol)を加え、氷冷攪拌下、塩化ベンゾイル(4.4ml、37.9mmol)を滴下した。室温で一晩攪拌し、原料の消失を確認後、0.01N HCl、水、NaHCO<sub>3</sub>水溶液、水の順で反応溶液を洗浄した。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥後、溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(C-200、400g、CHCl<sub>3</sub>)で精製し、化合物1を泡状物質として13.69g(67.9%)得た。

UV(MeOH): λ<sub>max</sub> 256nm, λ<sub>min</sub> 225nm.

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:

7.99-7.29(m, 6H, benzoyl group, C6-H),

5.76(d, 1H, J=11Hz,

C1'-H), 1.97(d, 3H, J=1.2Hz,

特開平2-264792 (6)

フィー (C-200、260g、ヘキサン：酢酸エチル=4:1)で精製し、泡状物質(化合物2)を3.96g(28.4%)得た。

UV(MeOH):  $\lambda_{\max}$  252nm,  $\lambda_{\min}$  225nm.

実施例3

(5-Methyl-2'-O-methyluridine(化合物3)の合成)

化合物2(6.99g、11.3mmol)をジオキサン100mlに溶解し、 $\text{CNH}_4\text{OH}$ (12.2ml)を加え、室温で5時間攪拌した。原料の消失を確認し、反応溶液を濃縮し、 $\text{CHCl}_3-\text{H}_2\text{O}$ で分液した。有機層を、水、 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液、水の順に洗浄した後、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、溶媒を減圧下留去後、ヘキサンから結晶し、5.46g(93.9%)の結晶性化合物を得た。

m.p.: 116.5~118.0 °C

mass m/e: 471 ( $\text{H}^+$ -isopropylラジカル)

計算値: C, 48.53; H, 5.88; N, 10.29

実験値: C, 48.36; H, 5.96; N, 10.37

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)$   $\delta$  ppm:

7.78(d, 1H,  $J=1.2\text{Hz}$ , C6'-H),

5.86(d, 1H,  $J=5.4\text{Hz}$ , C1'-H),

3.33(s, 3H, O2'-CH<sub>3</sub>),

1.78(s, 3H, C5-CH<sub>3</sub>).

因みに、化合物3は、尿から単離されたとの報告があるが(C. A., Vol. 101, 68654a(1984)、尿からの単離では単離できる量に自ら制限があり、上記の実施例1~3によって製造するのが極めて有利である。

実施例4

(メトキシ-5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-5'-メチル-ウリジン-3'-O-(N,N-ジイソプロピルアミノ)フォスフィン(化合物5)の合成)

元素分析:  $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}_2$ としての、

計算値: C, 53.70; H, 8.17; N, 5.45

実験値: C, 54.53; H, 8.13; N, 5.68

この化合物(4.00g、7.8mmol)をテトラヒドロフラン50mlに溶解し、Tetrabutylammonium fluoride(3.2ml、3.1mmol)を加え、室温で4.5時間攪拌した。ピリジン：水：MeOH=3:1:1(v/v)の溶液を100ml入れて反応溶液を希釈し、これにDowex 50(ピリジニウム型)を30ml加え、中和した。樹脂を通過後、反応溶液を濃縮し、 $\text{CHCl}_3-\text{H}_2\text{O}$ で分液した。水層を濃縮乾固した後、エタノールから結晶化を行い、化合物3を1.85g(87.2%)を得た。

UV(MeOH):  $\lambda_{\max}$  266nm,  $\lambda_{\min}$  233nm.

m.p.: 197.0~198.0 °C

mass m/e: 272( $\text{H}^+$ )

元素分析:  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ としての、

化合物3(0.544g、2.0mmol)ピリジン共沸後、5mlのピリジンに溶解しジメトキシトリチルクロライド(0.82g、2.4mmol)を加え、室温で4時間攪拌した。原料の消失を確認し、メタノール1mlを加え、反応を停止させた。溶媒を減圧下留去し、 $\text{CHCl}_3-\text{H}_2\text{O}$ で分液し、有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(C-200、40g、~4% MeOH/ $\text{CHCl}_3$ )で精製した後、*n*-ヘキサンから粉末化し、化合物4を0.92g(80%)得た。

この化合物4(281mg、0.49mmol)をピリジン共沸後、蒸留メチレンクロライドに溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(0.35ml、2.0mmol)を加えた。密栓した後、雰囲気アルゴン置換し、そこへchloro-N,N-diisopropylaminomethoxy phosphine(0.12ml、0.6mmol)を約1分かけて滴下した。室温で約60分放置し、原料の消失を確認

認し、(シリカゲルTLC法:移動度、酢酸エチル、原料 $R_f$ 値 0.43、精製部 $R_f$ 値 0.7)、酢酸エチル約15mlを加え、反応溶液を希釈した。飽和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残渣を得た。更に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(C-300、2.5g、酢酸エチル)で精製し、泡状物質として化合物5を0.34g(94%)を得た。

実施例5

(ヌクレオシド樹脂の合成)

化合物4(0.17g、3.0mmol)をピリジン共沸した後、塩化メチレン3mlに溶解し、無水コハク酸(47.8mg、4.5mmol)とジメチルアミノピリジン(55.5mg、0.46mmol)を加え、室温で2時間撹拌した。TLCで原料の消失を確認した後、反応液を0.5M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 水で洗浄した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマ

(100 $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_2$ /g、0.24g)のトリエチルアミン(15ml)--DMF(3ml)の懸濁液中へ加え、室温で一晩振とうした。反応液をろ過し、樹脂をDMF、ピリジン、塩化メチレンで順次洗浄した後、減圧乾燥した。

常法により定量し、ローディング量1 $\mu\text{mol}$ /29.4mgであることを確認した。

0.1Mジメチルアミノピリジン/ピリジン4.5mlと無水酢酸0.5mlを加えて10分間振とうした。反応液をろ過し、樹脂をピリジン、塩化メチレンで順次洗浄した後減圧下乾燥し、化合物6を得た。

実施例6

(デカリボアデニル酸(AA 10mer)の合成)

公知方法(E. Ohtsuka et al., Tetrahedron, 40, 47(1984)参照)に従い合成した $\text{N}^6$ -ベンゾイル-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-テトラヒドロピラニルアデノシ

トグラフィー(C-300、10g)で精製し、ノルマルヘキサンで粉末化し、0.18g(0.17mmol、88.9%)の3'-(2'-O-Methyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyluridiny)-monosuccinateを得た。

全量をDMF3mlに溶解し、ペンタクロロフェノール(87.1mg、約1.2当量)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(66.0mg、約1.2当量)を加え、室温で一晩撹拌した。TLCで原料の消失を確認し、生じた沈澱をろ別した後、溶媒を減圧下留去した。さらに、残渣にベンゼンを加え、析出した不溶物をろ別し、ろ液を濃縮した後、n-ヘキサンから粉末化し、pentachlorophenyl-3'-(2'-O-methyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyluridiny)-succinateを得た。収量0.23g、0.249mmol、収率92.3%。

この化合物(75.3mg、82 $\mu\text{mol}$ )をCPG樹脂

を公知方法(L. J. McBride et al., Tetrahedron Letters, 24, 245(1983)参照)に従い3'-O-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-メトキシホスホアミダイト誘導体に変換した。

即ち、 $\text{N}^6$ -ベンゾイル-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-テトラヒドロピラニルアデノシン(576.3mg、766.5 $\mu\text{mol}$ )をピリジン共沸により無水にした後、ジクロロメタン1mlに溶解した。この溶液に窒素ガス気流中ジイソプロピルエチルアミン(0.49ml)を加えた後、氷冷下クロロ-メトキシー-N,N-ジイソプロピルアミノホスフィン(0.17ml)を徐々に加えた。1時間放置後、薄層クロマトグラフィーにより原料の消失を確認した後、酢酸エチル10mlを加え希釈した。この希釈液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄し、酢酸エチル層を減圧下濃縮乾固した。得られた残渣を酢酸エチルに溶



特開平2-264792 (8)

解し、10gのシリカゲル(C-300)を充填したカラムクロマトグラフィー(移動相:酢酸エチル)により精製した。溶出された $N^6$ -ベンゾイル-5'-O-ジメトキシトリエチル-2'-O-テトラヒドロピラニルアデノシン-3'-O-(N,N-ジイソプロピルアミノ)メトキシホスホアミダイト(化合物7)の純粋画分を集め濃縮乾固し、0.67g(733.9 $\mu$ mol)の化合物7を95.7%の収率で得た。

次に、 $N^6$ -ベンゾイル-2'-O-テトラヒドロピラニルアデノシン(1 $\mu$ mol)を結合した固相担体(R. Kierzek et al., Biochemistry, 25, 7840~7846 (1986))を出発原料に用い、20 $\mu$ mol/140 $\mu$ lの濃度になるように溶解した化合物7のアセトニトリル溶液とともにDNA自動合成機(アプライドバイオシステムズ社製、モデル380A)にて鎖長延長反応を行なった。各縮合サ

で中和後、酢酸エチルにて洗浄したのち濃縮し、セファデックスG-25を詰めたゲル濾過カラムクロマトグラフィー(移動相:0.1M TEAB)を行なうことにより脱塩した。

完全に脱保護されたデカアデニル酸は、最後に逆相シリカゲル(YMC Pack ODS、C-18(山村科学社製))を用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製し、6.57 ODユニット、約50nmolのデカアデニル酸を5%の通算収率で単離した。

得られたデカアデニル酸は、陰イオン交換カラム(DEAE-2SW)を用いた高速液体クロマトグラフィーで分析を行い、ほぼ単一のピークを与えることを確認した。

#### 実施例7

(デカ(2'-O-メチル-5-メチルウリジン酸)すなわち $m^5U_{10mer}$ の合成)

イクルに先立つ脱ジメトキシトリチル化反応は、1%ジクロル酸/メチレンクロライド溶液を用いた。反応後の固相担体より切り出された部分的に保護基を有するデカアデニル酸のアモニア水溶液は、60℃で5時間加温した。次いで、この溶液を濃縮し、逆相シリカゲル(Prep PAK-500/C-18、ウォーターズ社製)を詰めたカラムクロマトグラフィーを行なうことにより精製した。即ち、移動相として5%から35%のアセトニトリルの直線濃度勾配をかけた50mMトリエチルアミン-炭酸緩衝液(pH 7.5、以下TEABと略す。)を用いて溶出し、5'末端にジメトキシトリチル基及び2'位水酸基にテトラヒドロピラニル基を有するデカアデニル酸の純粋画分を集め、濃縮乾固した。次に、この残渣を0.01Nの塩酸水溶液10mlに溶かしてpH 2.0に調整し、室温に24時間放置した。反応液は希釈したアモニア水

実施例5で得た2'-O-メチル-5-メチルウリジン(1 $\mu$ mol)を結合した固相担体を出発原料にして、実施例4で得た化合物5のアセトニトリル溶液(20 $\mu$ mol/140 $\mu$ l)を用いて、常法に従い実施例6と同様に(この場合は脱ジメチルトリチル化は、3%トリクロル酢酸ジクロメタン溶液を用いた)鎖長延長反応を行った。反応後の固相担体より切り出された5'末端にジメトキシトリチル基を有するデカ(2'-O-メチル-5-メチルウリジン酸)を実施例6と同様に逆相シリカゲルカラムを用いて分離精製した。

次に、この一部をとり溶媒を減圧留去した後、80%酢酸水溶液1mlを加え、室温で10分間放置した。反応液を減圧留去した後、更に水と減圧共沸することにより酢酸を除去した。残渣を水に溶解し酢酸エチルで洗浄後減圧留去し、実施例6で用いた逆相シリカゲルによる高速液体クロマトグラ

フィーにより精製し、7.28 ODユニットのデカ  
(2'-O-メチル-5-メチルウリジル酸)を  
得た。

得られたオリゴマーは陰イオン交換カラム(D  
EAE-2SW)を用いた高速液体クロマトグラ  
フィーで分析を行い単一のピークを与え、純粋で  
あることを確認した。

また、同様の方法により、デカデオキシチミジ  
ル酸(dT 10mer)を20.84 ODユニット、デカ(2'  
-O-メチルウリジル酸)(U 10mer)を15.4  
7 ODユニット得た。

#### 実施例 8

(T<sub>m</sub> 測定実験)

実施例 6 及び 7 により得たそれぞれのデカオリ  
ゴヌクレオチド量は、次のε値(計算値)により  
定量化した。

ε 値

γ A 10mer (相補鎖) : 123400

dT 10mer (対 照) : 81600

■<sup>5</sup> U 10mer (本発明) : 96800

U 10mer (対 照) : 96800

γ A 10mer (0.20 TOD、1.6nmol) と dT  
10mer、■<sup>5</sup> U 10mer、U 10mer のそれぞれ  
1.6nmol相当量をエッペンドルフチューブにとり、  
減圧乾固した。それぞれバッファー(0.01 M カ  
コシル酸ナトリウム塩、0.1M NaCl、  
1mM EDTA、pH 7.0) 300μlに溶解し、ベ  
ックマン社製 DU-8B 分光光度計を用いて、温  
度上昇速度を 2℃/min とし、吸光度変化を 3 回  
測定し、それらの平均値を求め、これら 3 種のハ  
イブリッドそれぞれの T<sub>m</sub> 値とした。

結果は次の第 1 表の通りであった(第 3 図)。

第 1 表

ハ イ ブ リ ッ ド	T <sub>m</sub> 値
(1) γ A 10mer - dT 10mer	18.9℃
(2) γ A 10mer - U 10mer	21.0℃
(3) γ A 10mer - ■ <sup>5</sup> U 10mer	31.1℃

図みに、各ハイブリッドの構造式は次の通りで

ある。

式中、N は 5-Methyluracil を意味する。

ハイブリッド (1) : 5' r(AAAAAAAAAA) 3'  
3' (TTTTTTTTTT)d 5'

ハイブリッド (2) : 5' r(AAAAAAAAAA) 3'  
3' (UUUUUUUUUU)■ 5'

ハイブリッド (3) : 5' r(AAAAAAAAAA) 3'  
3' (NNNNNNNNNN)■ 5'

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図 及び 第 2 図 は、それぞれ、実施例 1 ~ 3  
による化合物 3 の合成の概要及び実施例 4 による

化合物 5 の合成の概要を図示したものである。第  
3 図は、3 種のハイブリッドの温度変化に対する  
吸光度変化を示す(実施例 8)。

代理人(特許) 味の素株式会社  
代理人 弁護士 川 口 義 雄  
代理人 弁護士 中 村 至  
代理人 弁護士 船 山 武  
代理人 弁護士 霜 越 正 夫

